



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **11009293 A**(43) Date of publication of application: **19.01.99**

(51) Int. Cl.

C12P 11/00**C02F 3/34****C10G 32/00****C12S 1/02****/(C12P 11/00 , C12R 1:01) , (C12S
1/02 , C12R 1:01)**(21) Application number: **09164351**(22) Date of filing: **20.06.97**(71) Applicant: **SEKIYU SANGYO KASSEIKA
CENTER**(72) Inventor: **ISHII YOSHITAKA
OKUMURA KOICHI
KOBAYASHI MORIO
SUZUKI MASANORI****(54) MICROORGANISM CAPABLE OF DEGRADING
ALKYLATED HETEROCYCLIC SULFUR
COMPOUND**

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new strain belonging to the genus *Rhodococcus erythropolis*, having the ability to efficiently degrade hard-to-decompose alkylated benzothiophenes and alkylated dibenzothiophenes, and useful for e.g. the desulfurization of fossil fuels such as petroleum.

SOLUTION: This new strain, which belongs to the genus

Rhodococcus erythropolis [e.g. *Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1 strain (FERM P-16277)], has the ability to degrade hard-to-decompose alkylated benzothiophenes and/or alkylated dibenzothiophenes through selectively cleaving the C-S bonds thereof, and is useful for the desulfurization of the above compounds contained in fossil fuels such as petroleum. This new strain was obtained by screening the ability to degrade the above compounds using various kinds of soil as isolation source collected throughout Japan.

COPYRIGHT: (C)1999,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-9293

(43) 公開日 平成11年(1999) 1月19日

(51) Int.Cl.⁶
C 1 2 P 11/00
C 0 2 F 3/34
C 1 0 G 32/00
C 1 2 S 1/02
// (C 1 2 P 11/00

識別記号

F I

C 1 2 P 11/00
C 0 2 F 3/34
C 1 0 G 32/00
C 1 2 S 1/02

Z

A

審査請求 未請求 請求項の数13 O L (全 13 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平9-164351

(22) 出願日 平成9年(1997) 6月20日

(71) 出願人 590000455

財団法人石油産業活性化センター
東京都港区虎ノ門四丁目3番9号

(72) 発明者 石井 義孝

静岡県静岡市谷田23-73 アートビル I I
-305号

(72) 発明者 奥村 弘一

静岡県静岡市音羽町2-12-208

(72) 発明者 小林 守雄

静岡県清水市袖師町384-1 ビラマルヤ
マ302号

(72) 発明者 鈴木 正則

静岡県清水市西久保136-1 1-134

(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外1名)

(54) 【発明の名称】 アルキル化複素環式硫黄化合物を分解する微生物

(57) 【要約】

【解決手段】 難分解性アルキル化ベンゾチオフェンおよび/またはアルキル化ジベンゾチオフェン系化合物を含む物質にアルキル化ベンゾチオフェンおよび/またはアルキル化ジベンゾチオフェン系化合物のC-S結合を選択的に切断する能力を有する微生物又は該微生物が産生する酵素を作用させることを特徴とする前記物質中の前記化合物から硫黄を分離、除去する方法、及び前記微生物又は該微生物が産生する酵素を用いた石油の脱硫方法。

【効果】 本発明の微生物によれば、例えば、化石燃料中に含まれる高度難除去性複素環式硫黄化合物であるアルキル化ジベンゾチオフェン類及びアルキル化ベンゾチオフェン類のC-S結合を特異的に効率よく分解することができる。したがって、この微生物を用いて石油等の脱硫を効果的に行うことができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 難分解性アルキル化ベンゾチオフェンおよび/ またはアルキル化ジベンゾチオフェン系化合物を含む物質にアルキル化ベンゾチオフェンおよび/ またはアルキル化ジベンゾチオフェン系化合物のC-S結合を選択的に切断する能力を有する微生物又は該微生物が産生する酵素を作用させることを特徴とする前記物質中の前記化合物から硫黄を分離、除去する方法。

【請求項 2】 物質が、液状物質である請求項 1 記載の硫黄を分離、除去する方法。

【請求項 3】 微生物が、ロドコッカス エリスロポリスの株である請求項 1 又は 2 記載の方法。

【請求項 4】 ロドコッカス エリスロポリスの株が、ロドコッカス エリスロポリス KA2-5-1株である請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】 難分解性アルキル化ジベンゾチオフェン類が、1-メチルジベンゾチオフェン、2-メチルジベンゾチオフェン、2-エチルジベンゾチオフェン、3-メチルジベンゾチオフェン、3-エチルジベンゾチオフェン、4-メチルジベンゾチオフェン、4, 6-ジメチルジベンゾチオフェン、2, 8-ジメチルジベンゾチオフェン、3, 4, 6-トリメチルジベンゾチオフェン、3, 4, 6, 7-テトラメチルジベンゾチオフェンであることを特徴とする請求項 1 乃至 3 のいずれかの項に記載の分解方法。

【請求項 6】 難分解性アルキル化ベンゾチオフェン類が、3-メチルベンゾチオフェンであることを特徴とする請求項 1 乃至 3 のいずれかの項に記載の分解方法。

【請求項 7】 難分解性アルキル化ベンゾチオフェンおよび/ またはアルキル化ジベンゾチオフェン系化合物を含む石油にアルキル化ベンゾチオフェンおよび/ またはアルキル化ジベンゾチオフェン系化合物のC-S結合を選択的に切断する能力を有する微生物又は該微生物が産生する酵素を作用させることを特徴とする、石油の脱硫方法。

【請求項 8】 微生物が、ロドコッカス エリスロポリスの株である請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】 ロドコッカス エリスロポリスの株が、ロドコッカス エリスロポリス KA2-5-1株である請求項 8 記載の方法。

【請求項 10】 難分解性アルキル化ジベンゾチオフェン類が、1-メチルジベンゾチオフェン、2-メチルジベンゾチオフェン、2-エチルジベンゾチオフェン、3-メチルジベンゾチオフェン、3-エチルジベンゾチオフェン、4-メチルジベンゾチオフェン、4, 6-ジメチルジベンゾチオフェン、2, 8-ジメチルジベンゾチオフェン、3, 4, 6-トリメチルジベンゾチオフェン、3, 4, 6, 7-テトラメチルジベンゾチオフェンであることを特徴とする請求項 7 乃至 9 のいずれかの項に記載の分解方法。

【請求項 11】 難分解性アルキル化ベンゾチオフェン類が、3-メチルベンゾチオフェンであることを特徴とする請求項 7 乃至 9 のいずれかの項に記載の分解方法。

【請求項 12】 難分解性アルキル化ジベンゾチオフェン類および/ またはアルキル化ベンゾチオフェン類を分解する能力を有するロドコッカス エリスロポリスに属する菌株。

【請求項 13】 菌株がロドコッカス エリスロポリス KA2-5-1株であることを特徴とする請求項 12 記載の菌株。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、微生物を利用するチオフェン系化合物、すなわちベンゾチオフェン、ジベンゾチオフェンおよびそれらの置換誘導体の分解方法に関するものである。特に、石油等の化石燃料中に含まれるベンゾチオフェンやジベンゾチオフェンおよびこれらの置換誘導体類を分解して、脱硫する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

（1）従来の水素化脱硫方法

石油のような炭化水素燃料から硫黄を除去する脱硫のための方法としては、アルカリ洗浄や溶剤脱硫などの方法も知られているが、現在では水素化脱硫が主流となっている。水素化脱硫は、石油留分中の硫黄化合物を触媒の存在下で水素と反応させ、硫化水素として除去して製品の低硫黄化を図る方法である。触媒としては、アルミナを担体としたコバルト、モリブデン、ニッケル、タングステン、などの金属触媒が使用される。モリブデン担持アルミナ触媒の場合には、触媒性能を向上させるために、通常コバルトやニッケルが助触媒として加えられる。金属触媒を用いた水素化脱硫は、現在世界中で広く使用されているきわめて完成度の高いプロセスであることは疑いのないことである。しかし、より厳しい環境規制に対応した石油製品を作るためのプロセスという観点からは、いくつかの問題点がある。以下にその例を簡単に記載する。

【0003】金属触媒は、一般にその基質特異性が低く、このため多様な種類の硫黄化合物を分解し、化石燃料全体の硫黄含量を低下させる目的には適しているが、特定のグループの硫黄化合物に対してはその脱硫効果が不十分となることがあると考えられる。たとえば、脱硫後の軽油中にはなおも種々の複素環式有機硫黄化合物が残存している。このように金属触媒による脱硫効果が不十分となる原因の一つは、これらの有機硫黄化合物中の硫黄原子の周囲に存在する置換基による立体障害が考えられる。これらの置換基のうち、メチル置換基の存在が水素化脱硫における金属触媒の反応性に及ぼす影響は、チオフェン、ベンゾチオフェン、ジベンゾチオフェンなどについて検討されている。それらの結果によると、一

般的には置換基の数が増すほど脱硫反応性は減少するが、置換基の位置が反応性に及ぼす影響もきわめて大きいことが明らかである。メチルジベンゾチオフェン類の脱硫反応性を比較し、置換基による立体障害が金属触媒の反応性に及ぼす影響が非常に大きいことを示した報告は、たとえば、Houalla, M., Broderick, D. H., Sapre, A. V., Nag, N. K., de Beer, V. H. J., Gates, B. C., Kwart, H. J. Catal. 61, 523-527 (1980)に見られる。実際、これらのジベンゾチオフェンの種々のアルキル化誘導体が軽油中にかなりの量存在することが知られている（たとえば、Kabe, T., Ishihara, A. and Tajima, H. Ind. Eng. Chem. Res., 31, 1577-1580 (1992)）。また、我々はベンゾチオフェン類についても種々のアルキル化誘導体が、ジベンゾチオフェンのアルキル化誘導体と同様に水素化脱硫軽油中にかなりの量残存していることを確認している。

【0004】上記のように水素化脱硫に抵抗性を示す有機硫黄化合物を脱硫するためには、現在用いられているよりも高い反応温度や圧力が必要とされ、また、添加する水素の量も非常に増大すると考えられている。このような水素化脱硫プロセスの改良は、ばく大な設備投資と運転コストを必要とすることが予想される。このような水素化脱硫に抵抗性を示す有機硫黄化合物を主たる硫黄化合物種として含むものとしては、たとえば、軽油があり、軽油のより高度な脱硫（超深度脱硫）を行う場合には上記のような水素化脱硫プロセスの大幅な改良が要求される。

【0005】一方、生物が行う酵素反応は比較的穏和な条件下で進行し、しかも酵素反応の速度自体は、化学触媒を用いた反応の速度と遜色ないという特徴を有している。さらに、生体内で起こる多種多様の生物反応に適切に対応する必要があるため、非常に多くの種類の酵素が存在し、それらの酵素は一般的に非常に高い基質特異性を示すことが知られている。このような特徴は、微生物を用いて化石燃料中に含まれる硫黄化合物中の硫黄の除去を行ういわゆるバイオ脱硫反応においても生かされるものと期待されている（Monticello, D. J., Hydrocarbon Processing 39-45 (1994)）。

【0006】（2）従来のバイオ脱硫方法：細菌を用いて石油から硫黄を除去する方法については、多数の報告がある。Joachimらは、シュードモナス（*Pseudomonas*）IECC 39株を用いて30℃で粘度の高い重油画分を連続的な処理を行うことにより、2日で60-80%の脱硫率を観察している（Bauch, J., Herbert, G., Hieke, W., Eckart, V., Koehler, M., Babenz

in, H. D., Chemical Abstracts 82530y vol. 83 (1975)）。Yudaは、シュードモナス ハコネシス（*Pseudomonas hacoensis*）を石油と接触させ、水溶性の化合物へと変換させることを報告している（Yuda, S., 日本特許公開番号 75, 107, 002 ; Chemical Abstracts 46982j vol. 84 (1976)）。また、Leeらは、硫黄酸化細菌株のチオバチルス チオオキシダンス（*Thiobacillus thiooxidans*）と硫黄還元細菌株シュードモナス（*Pseudomonas*） spp. による原油、重質軽油、ケロシン、ナフサの脱硫を報告している（Lee, M. J., Hah, Y. C., Lee, K.-W. Chemical Abstracts 145448s vol. 85 (1976)）。彼らは、種々の硫黄酸化細菌および硫黄還元細菌の脱硫能を調べ、チオバチルス チオオキシダンス（*Thiobacillus thiooxidans*）が最も効果的な硫黄酸化能を有し、シュードモナス プトレハシエンス（*Pseudomonas putrefaciens*）とデスルフォビブリオ デスルフリカンス（*Desulfovibrio desulfuricans*）が最も効果的な硫黄還元能を有しているとしている（Lee, M. J., Hah, Y. C., Lee, K.-W. Chemical Abstracts 156414d vol. 85 (1976)）。硫黄還元性のシュードモナス（*Pseudomonas*）株7種の分離も同じグループにより報告されている。また、Eckartらは、Romashkino原油や燃料油のシュードモナス デスモリティカム（*Pseudomonas desmolyticum*）による酸化的脱硫を報告している（Eckart, V., Hieke, W., Bauch, J., Gentzsch, H. Chemical Abstracts 142230q vol. 94 (1981) ; Eckart, V., Hieke, W., Bauch, J., Gentzsch, H. Chemical Abstracts 147259c vol. 97 (1982)）。シュードモナス（*Pseudomonas*）属細菌により行われるこれらの脱硫反応に関しては、その分解産物が同定されており、脱硫反応機構が明らかにされた微生物では、すべて油中の硫黄化合物分子中のC-C結合を切断する反応を利用していることが分かっている。

【0007】これらの場合、ジベンゾチオフェンのベンゼン環中のC-C結合が攻撃を受け、油から抽出可能な種々の水溶性物質を生じる。しかし、この反応により、油中の他の芳香族分子が攻撃を受け、その結果かなりの量の炭化水素が液相に移動することになる（Hardegen, F. J., Coburn, J. M. and Robert, R. L., Chem. Eng. Progress, 80, 63-67 (1984)）。このようなことは石油の総熱量単位の低下を招くことになり、工業的に受け入れられない反応である。また、このタイプのジベンゾチオフェン酸化分解菌は、児玉等が報告しているように酸化産物として水溶性のチオフェン化合物（主として3-ヒドロキシ-2-ホルミルベンゾチオフェン）を与えるが、これは液相から除去するのが困難な物質である。酵素反応がイオウ攻撃型でなくC-C結合攻撃型であるこれらの微生物系は、原油中の高分子画分から有機イオウを

除去する際に機能的でない、イオウ含量の高い化石燃料のバイオプロセッシングにおいてはその実用性が限定されているが、その主な理由は以下の3点である。

1) ジベンゾチオフェンの炭素環の攻撃は、しばしばアルキル置換基やアリル置換基を持つジベンゾチオフェンの2位及び3位の位置で起こる。これらの位置で置換されたジベンゾチオフェンはKodama経路の基質とはならない。2) 炭素骨格破壊経路は燃料のエネルギー含量を低下させる。3) 炭素骨格破壊経路の主要な産物は3-ヒドロキシ-2-ホルミルベンゾチオフェンであり、分解されて最終的に硫酸塩を生成するのは非常に少量のジベンゾチオフェンでしかない、十分な脱硫は起こらないことになる。

【0008】原油や石炭のみならず硫黄を含んだモデル化合物を分解し、ヘテロ原子である硫黄を選択的に除去して、硫酸塩や水酸化化合物を産生する微生物類が報告されている。このタイプの反応は、その代謝産物の構造から考えて、硫黄化合物中のC-S結合を特異的に切断して、その結果硫黄を硫酸塩の形で遊離する反応であると考えられる。このようなC-S結合切断型反応は、エネルギーロスにつながるC-C結合の攻撃はしないので、硫黄原子のみを硫黄化合物から除去できるので、脱硫反応としては理想的である。Isbister, J. D. and Kobylinski, E. A. (Microbial desulfurization of coal, in Coal Science and Technology, Ser. 9, p. 627 (1985)) は、好気性で従属栄養性の非酸性土壌細菌 *Pseudomonas* CB1、アシネトバクター (*Acinetobacter*) CB2 がチオフェン硫黄を硫酸塩に変換することを報告した。ベンチスケールの連続バイオリクターを使用した場合、Illinois #6の石炭の有機硫黄含量がCB1により47%減少した。ジベンゾチオフェンの脱硫における中間体としてはジベンゾチオフェンスルホキシド、ジベンゾチオフェンスルホン、2,2'-ジヒドロキシビフェニルが同定されている。これとは別に、未同定の土壌分離菌が4つの異なったタイプの石炭から硫酸塩として有機硫黄分の35-45%を除去することが報告されている (Finnerty, W. R. and Robinson, M., Biotechnol. Bioengineer. Symp. #16, 205-221 (1986))。また、ロドコッカス ロドクロウス (*Rhodococcus rhodochrous*) 分離株 ATCC53968 がジベンゾチオフェンをヒドロキシビフェニルと硫酸塩に変換する硫黄攻撃型経路を有することが示されているが、この菌により原油や石炭中の有機硫黄の含量が70%減少するという (Kilbane, J. J. Resources, Conservation and Recycling, 3, 6

9-70 (1990))。コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) sp. の細菌についてもジベンゾチオフェン分解経路が記述されており、同じくジベンゾチオフェンを酸化してジベンゾチオフェンスルホキシド、ジベンゾチオフェンスルホンを経て2-ヒドロキシビフェニルと硫酸塩を生成するものである (Ohmori, T., Monna, L., Saiki, Y. and Kodama, T. Appl. Environ. Microbiol., 58, 911-915, 1992)。この場合、2-ヒドロキシビフェニルはさらに硝酸塩となって2つの異なったヒドロキシニトロビフェニルを生じる。さらに最近、ブレビバクテリウム (*Brevibacterium*) sp. DOによるジベンゾチオフェンの安息香酸や亜硝酸塩への酸化 (van Afferden, M., Schacht, S., Klein, J. and Trper, H. G. Arch. Microbiol., 153, 324-328, 1990) や *Pseudomonas* sp. OS1によるベンジルメチルスルフィドのベンズアルデヒドへの酸化 (van Afferden, M., Tappe, D., Beyer, M., Trper, H. G. and Klein, J. Fuel 72, 1635-1643, 1993) も報告されている。アースロバクター (*Arthrobacter*) K3bはブレビバクテリウム (*Brevibacterium*) と類似の反応を行うことが報告されており、ジベンゾチオフェンスルホンを基質として用いた場合、亜硫酸塩と安息香酸が産生される (Dahlberg, M. D. (1992) Third International Symposium on the Biological Processing of Coal, May 4-7, Clearwater Beach, FL, pp. 1-10. Electric Power Research Institute, Palo Alto, C A.)。一方、硫黄を含んだ芳香族複素環化合物の硫化水素への変換を非水溶媒で行う新規な系も報告されている (Finnerty, W. R. Fuel 72, 1631-1634, 1993)。未同定株 FE-9 は100%ジメチルホルムアミド中で水素雰囲気下にジベンゾチオフェンをビフェニルと硫化水素に、また空気存在下でヒドロキシビフェニルと硫酸塩にそれぞれ変換する。また、この株は、同じ溶媒中で水素雰囲気下でチアントレンをベンゼンと硫化水素に、空気存在下でベンゼンと硫酸塩に変換すると報告されている。これらの好氣的ジベンゾチオフェン分解細菌とは別に、嫌気性の硫酸還元菌がジベンゾチオフェンをビフェニルと硫化水素に変換し、また、石油有機硫黄を硫化水素にバイオ変換することも示されている (Kim, H. Y., Kim, T. S. and Kim, B. H., Biotechnol. Lett. 12, 757-760, 1990a; Kim, T. S., Kim, H. Y. and Kim, B. H. Biotechnol. Lett. 12, 761-764, 1990b)。我々の知る限りでは、表1に示すような硫黄攻撃型のバイオ脱硫反応系の報告がある。しかし、これらのC-S結合切断型の脱硫菌すべてについて、ジベンゾチオフェンを分解する活性は知られているが、ベンゾチオフェン系化合物に対する分解活性は記載されていない。

【0009】

【表1】

表1 C-S結合攻撃型細菌

菌株	基質	分解産物	文献
<i>Pseudomonas</i> sp. CB1	ジベンゾチオフェン; 石炭	ヒドロキシビフェニル+環化水素	Isblaster 5 (1985)
<i>Achnalobacter</i> sp. CB2	ジベンゾチオフェン	ヒドロキシビフェニル+環化水素	Isblaster 5 (1985)
Gram-positive bacteria	石炭	環化水素	Crawford 5 (1990)
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> IGTS8	ジベンゾチオフェン;	ヒドロキシビフェニル+環化水素	Kilbane (1989)
(ATCC 53968)	石油		
<i>Desulfotribrio desulfuricans</i>	ジベンゾチオフェン	ビフェニル+環化水素	Klm 5 (1990)
<i>Corynebacterium</i> sp. SY-1	ジベンゾチオフェン	ヒドロキシビフェニル+環化水素	Omori 5 (1992)
<i>Brevibacterium</i> sp. DO	ジベンゾチオフェン	安息香酸+環化水素	van Alferden 5 (1990)
Gram-positive bacterium FE-9	ジベンゾチオフェン;	ビフェニル+環化水素	Finnerty (1983)
	チアントレン	ベンゼン+環化水素	
<i>Pseudomonas</i> sp. OS1	ベンジルメチルスルフィド	ベンズアルデヒド	van Alferden (1993)
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	ジベンゾチオフェン	ヒドロキシビフェニル	Wong 5 (1994)
<i>Rhodococcus erythropolis</i> D-1, H-2	ジベンゾチオフェン	ヒドロキシビフェニル	Izum 5 (1994), Ohshiro 5 (1995)
<i>Agrobacterium</i> sp.	ジベンゾチオフェン	ヒドロキシビフェニル	Constant 5 (1994)
<i>Xanthomonas</i> sp.	ジベンゾチオフェン	ヒドロキシビフェニル	Constant 5 (1994)
<i>Arthrobacter</i> sp.	ジベンゾチオフェン	ヒドロキシビフェニル	Lee 5 (1995)
<i>Arthrobacter</i> K3b	ジベンゾチオフェン+スルホン	安息香酸+環化水素	Dahlberg (1992)

【0010】ベンゾチオフェンに対する分解活性に関しては、Finnertyらが、シュードモナス スタッツェリ (*Pseudomonas stutzeri*)、シュードモナス アルカリゲネス (*Pseudomonas alcaligenes*)、シュードモナス プチダ (*Pseudomonas putida*) に属する株がジベンゾチオフェン、ベンゾチオフェン、チオキサンテン、チアントレンを分解して、水溶性の物質に変換

することを報告している (Finnerty, W. R., Shockley, K., Attaway, H. in Microbial Enhanced Oil Recovery, Zajic, J. E. et al. (eds.) Penwell, Tulsa, Okla., 83-91 (1983)。この場合、酸化反応は55℃でも進むとしている。しかし、これらのシュードモナス (*Pseudomonas*) 菌株によるジベンゾチオフェンの分解産物は、Kodamaらが報告している3-ヒドロキシ-2-ホルミルベンゾチオフェンであった (Monticello, D. J.,

Bakker, D., Finnerty, W.R. Appl. Environ. Microbiol., 49, 756-760 (1985)). これらのシュードモナス (*Pseudomonas*) 菌株によるジベンゾチオフェンの酸化活性は、硫黄を含まない芳香族炭化水素であるナフタレンやサリチル酸により誘導を受け、クロラムフェニコールにより阻止される。このことから、これらのシュードモナス (*Pseudomonas*) 菌株によるジベンゾチオフェンの分解反応は、芳香環中のC-C結合を切断することによる分解を基礎としていることが分かる。ベンゾチオフェンの分解機構は明らかにされていないが、ジベンゾチオフェンがC-C結合切断反応による環開裂により分解されることから、同様の分解機構によりベンゾチオフェンも分解されるものと推測される。

【0011】 上述のように、今までに発見されている常温でジベンゾチオフェンをC-S結合特異的に分解する菌でベンゾチオフェン類も分解できるという報告を我々は知らない。C-S結合を特異的に切断するが、C-C結合は切断しないでそのまま残すタイプの有機硫黄化合物の分解反応が実際の石油の脱硫方法として望ましいことは上記（従来のバイオ脱硫方法）の通りである。油中には、複素環硫黄化合物としてはジベンゾチオフェン類の他にベンゾチオフェン類が存在することが知られている。特に、通常の水素化脱硫および微生物脱硫を経た軽油中にもなお、ある種のアルキル化ジベンゾチオフェン類以外にアルキル化ベンゾチオフェン類が残存している。すなわち、高度難除去性硫黄化合物として、アルキル化ジベンゾチオフェン類及びアルキル化ベンゾチオフェン類が存在しているわけであり、これらの両方の種類のアルキル化複素環硫黄化合物をC-S結合特異的に分解し、脱硫することができる菌を探索し、脱硫に用いれば、その効率が上昇することが期待される。また、複数の種類の脱硫菌を使用しなくてもすむことになり、微生物脱硫プロセスが簡易なものとなることも期待される。結論として、常温でジベンゾチオフェンおよびベンゾチオフェンのアルキル置換誘導体分子中のC-S結合を切断する活性を同時に有し、水溶性の物質の形で、脱硫産物を生じる微生物を利用するのがバイオ脱硫プロセスとして最も望ましい。

【0012】 前述のように、C-S結合切断型のジベンゾチオフェン分解反応を行う微生物は、いくつかの属の細菌で知られている。たとえば、ロドコッカス (*Rhodococcus*) sp. のATCC53968は最もよく調べられたジベンゾチオフェン分解菌株であり、ジベンゾチオフェンの硫黄原子に酸素原子を付加し、ジベンゾチオフェンスルホキシドからジベンゾチオフェンスルホンを生じ、ついで2-ヒドロキシビフェニル-2-スルフィン酸塩を経て2-ヒドロキシビフェニルを生成する反応を行う。この菌はベンゾチオフェンを唯一の硫黄源として利用し、増殖することはできない (Kayser, K. J., Bielaga-Jones, B. A., Jackowski, K., Odusan, O., and Kilbane, J. J. J. Gen.

Microbiol., 139, 3123-3129 (1993))。この事実は、ロドコッカス (*Rhodococcus*) sp. のATCC53968は、ベンゾチオフェンを分解することができないことを意味している。また、この菌株のアルキル化ベンゾチオフェン類に対する分解性に関しては現在に至るまでそのような記載が存在することを我々は知らない。

【0013】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、難分解性アルキル化ベンゾチオフェンおよびアルキル化ジベンゾチオフェン系化合物に作用し、それらを分解する能力を有する微生物を自然界からスクリーニングし、このような微生物を実際にアルキル化ベンゾチオフェン系化合物およびアルキル化ジベンゾチオフェン系化合物に作用させて、そのC-S結合を切断することにより、硫黄を遊離させる方法を開発することである。

【0014】

【課題を解決するための手段】 本発明は難分解性アルキル化ベンゾチオフェンおよび/またはアルキル化ジベンゾチオフェン系化合物を含む物質にアルキル化ベンゾチオフェンおよび/またはアルキル化ジベンゾチオフェン系化合物のC-S結合を選択的に切断する能力を有する微生物又は該微生物が産生する酵素を作用させて前記物質中の前記化合物から硫黄を分離、除去する方法である。そして、上記物質としては、石油等の液状物質が挙げられる。

【0015】 さらに、本発明は難分解性アルキル化ベンゾチオフェンおよび/またはアルキル化ジベンゾチオフェン系化合物を含む石油にアルキル化ベンゾチオフェンおよび/またはアルキル化ジベンゾチオフェン系化合物のC-S結合を選択的に切断する能力を有する微生物又は該微生物が産生する酵素を作用させることを特徴とする、石油の脱硫方法である。

【0016】 上記微生物としては、ロドコッカス エリスロポリス (*Rhodococcus erythropolis*) KA2-5-1 株が挙げられる。また、上記難分解性アルキル化ジベンゾチオフェン類としては、1-メチルジベンゾチオフェン、2-メチルジベンゾチオフェン、2-エチルジベンゾチオフェン、3-メチルジベンゾチオフェン、3-エチルジベンゾチオフェン、4-メチルジベンゾチオフェン、4,6-ジメチルジベンゾチオフェン、2,8-ジメチルジベンゾチオフェン、3,4,6-トリメチルジベンゾチオフェン、3,4,6,7-テトラメチルジベンゾチオフェン等が、上記難分解性アルキル化ベンゾチオフェン類としては、3-メチルベンゾチオフェン等がそれぞれ挙げられる。

【0017】 さらに、本発明は、難分解性アルキル化ジベンゾチオフェン類および/またはアルキル化ベンゾチオフェン類を分解する能力を有するロドコッカス エリスロポリス (*Rhodococcus erythropolis*) に属する菌株、たとえば、ロドコッカス エリスロポリス KA2-5-1の菌

株である。

【0018】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。
本発明に使用する微生物としては、本発明者が日本各地から採取した多種類の土壌を分離源としてスクリーニン

グによって見出したもので、たとえば、その例としてロドコッカス エリスロポリス KA2-5-1株が挙げられる。
このKA2-5-1株は、次の菌学的性質を有する。

【0019】

細胞の形態	桿菌及び球菌
色	ベージュ
グラム染色	+
孢子形成	-
運動性	-
カタラーゼ試験	+
オキシダーゼ	-
37℃での増殖	+
41℃での増殖	-
45℃での増殖	-
16S rDNAの部分配列	ロドコッカス エリスロポリスの16S rDNAの 分配列

(95-730の領域)と99.8%の相同性を示す。

【0020】また、ペプチドグリカン中のジアミノ酸としては、meso-ジアミノピメリン酸が検出された。ミコバクテリウム(Mycobacterium)属に関連した細菌類に特有な脂肪酸であるミコール酸の鎖長を高温ガスクロマトグラフィーで決定し、その分離パターンをデータベースを用いてロドコッカス(Rhodococcus)のミコール酸の分離パターンと比較したところ、ロドコッカス エリスロポリスのものと高い類似性を示した。他の脂肪酸も分析した結果、分岐しない飽和脂肪酸や不飽和脂肪酸に加え、ツベルクロスステアリン酸が検出された。この脂肪酸パタ

ーンは、Rhodococcus属のすべてのメンバーおよびミコバクテリウム(Mycobacterium)、ノカルディア(Nocardia)、ジエッチア(Dietzia)、ツカムレラ(Tsukamurella)属の細菌及びある種の Corynebacteri a) 種の細菌に見られる。これらの菌の中で、ロドコッカス エリスロポリス KA2-5-1株の脂肪酸パターンと最も類似した脂肪酸パターンを示したのは、ロドコッカス エリスロポリスであった。

【0021】

脂肪酸組成

	分岐	16:0	16:1	18:0	18:1	18-Me
R.erythropolis	-	++	+	+	++	++
KA2-5-1	-	++	+	+	++	++

0%, -; 1-5%, (+); 5-15%, +; 15-30%, ++; 分岐、分岐脂肪酸 (イソヘキサデカン酸; 16:0、ヘキサデカン酸; 18-Me、ツベルクロスステアリン酸

【0022】さらに、35種類の炭素源についてそれらがロドコッカス エリスロポリス KA2-5-1株に利用されるか否かを調べたところ、ロドコッカス エリスロポリスの炭素源利用パターンと完全に一致した。これらの結果から、KA2-5-1株はRhodococcus erythropolis (ロドコッカス エリスロポリス) 株と同定された。このロドコッカス エリスロポリス KA2-5-1株は、平成9年6月17日に工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-16277として寄託されている。

【0023】この微生物の培養は微生物の通常の培養法にしたがって行われる。培養の形態は液体培養が好ましい。培地の栄養源としては通常用いられているものが広く用いられる。炭素源としては利用可能な炭素化合物であればよく、例えば、グルコース、スクロース、ラクトース、フルクトース、エタノールなどが使用される。窒素源としては利用可能な窒素化合物であればよく、例え

ばペプトン、ポリペプトン、肉エキス、酵母エキス、大豆粉、カゼイン加水分解物、などの有機栄養物質も使用できる。脱硫反応に影響を与える可能性のある硫黄化合物を含まない培地で培養するのが望ましい場合には、塩化アンモニウムのような無機窒素化合物も使用できる。そのほか、リン酸塩、炭酸塩、マグネシウム、カルシウム、カリウム、ナトリウム、鉄、マンガン、亜鉛、モリブデン、タングステン、銅、ビタミン類、などが必要に応じて用いられる。培養は、pH6~8、温度30℃付近の温度で振盪または通気条件下で好氣的に1日ないし2日行う。

【0024】ロドコッカス エリスロポリス KA2-5-1株は、1-メチルジベンゾチオフェン、2-メチルジベンゾチオフェン、2-エチルジベンゾチオフェン、3-メチルジベンゾチオフェン、3-エチルジベンゾチオフェン、4-メチルジベンゾチオフェン、4、6-ジメチル

ジベンゾチオフェン、2, 8-ジメチルジベンゾチオフェン、3, 4, 6-トリメチルジベンゾチオフェン、3, 4, 6, 7-テトラメチルジベンゾチオフェンおよび3-メチルベンゾチオフェンなどの複素環硫黄化合物を分解する性質を有している。たとえば、本微生物ロドコッカス エリスロポリス KA2-5-1株によるアルキル化ジベンゾチオフェンの分解の結果、脱硫産物として生成する主たる化合物は後述の実施例3に示すようにヒドロキシ体であった。この発明における生成物の構造を解析するためには、たとえばジベンゾチオフェンを唯一の硫黄源として含む培地で本微生物株をたとえば30℃で培養し培養液を得る。得られた培養液を遠心分離し、上清のpHを約2に調整後酢酸エチルで抽出した。抽出物は主としてガスクロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー/質量スペクトル分析により分析した。必要に応じて、¹H-核磁気共鳴スペクトル分析、紫外線吸収スペクトル分析を行った。その結果、ジベンゾチオフェンは脱硫されて2-ヒドロキシビフェニルに、また、その他のアルキル化ジベンゾチオフェンは脱硫されて各々の基質化合物に対応するヒドロキシ体に、それぞれ変換されることが確認されている。

【0025】常温性脱硫菌、たとえば、本発明に記載のロドコッカス エリスロポリス KA2-5-1株は、菌体を培養後、分解を目的とする有機硫黄化合物とそれらの培養菌体を接触させることにより、該有機硫黄化合物を分解させることができる。このような休止菌体反応はたとえば以下のようにして行うことができる。

【0026】菌体調製は、新鮮な培地に対し適当量、たとえば1～2%容量の種菌を接種し、30℃で往復あるいは回転振とう培養を行うことによりできる。この際、種菌としては対数増殖期後期のものが好適であるが、対数増殖期初期から定常期のいずれの状態の菌でも構わない。また、接種量も必要に応じて容量を増減できる。培地としては常温性脱硫菌培地が好適であるが他の培地でも構わない。培地の栄養源としては通常用いられているものが広く用いられる。炭素源としては利用可能な炭素化合物であればよく、例えば、グルコース、スクロース、ラクトース、フルクトース、エタノールなどが使用される。窒素源としては利用可能な窒素化合物であればよく、例えばペプトン、ポリペプトン、肉エキス、酵母エキス、大豆粉、カゼイン加水分解物、などの有機栄養物質も使用できる。脱硫反応に影響を与える可能性のある硫黄化合物を含まない培地で培養するのが望ましい場合には、塩化アンモニウムのような無機窒素化合物も使用できる。そのほか、リン酸塩、炭酸塩、マグネシウム、カルシウム、カリウム、ナトリウム、鉄、マンガ、ン、亜鉛、モリブデン、タングステン、銅、ビタミン類、などが必要に応じて用いられる。通常の培養は、約30℃で振盪または通気条件下で好氣的に1日ないし2日行う。ただし、培養温度は30℃が好適であるが、25℃～

37℃近辺の温度範囲にある任意の温度でも構わない。

【0027】培養して得られた菌体は、遠心分離等の手段により分離集菌して、菌体を洗浄後再度集菌して休止菌体反応に使用するのが望ましい。この際、菌体は対数増殖期中期から後期で集菌するのが好適であるが、対数増殖期初期から定常期の菌体でも構わない。分離集菌のための手段としては、遠心分離の他、濾過や沈降分離などいかなる方法を用いても構わない。菌体の洗浄には、生理食塩水、リン酸緩衝液、トリス緩衝液等のいかなる緩衝液も使用でき、また水を使用して菌体洗浄を行っても構わない。

【0028】休止菌体反応は、菌体を適当な緩衝液に懸濁して調製した菌懸濁液に基質を添加して行う。緩衝液としては種々の緩衝液を使用できる。緩衝液のpHは、pH 6～7が好適であるが他のpHでも構わない。また、緩衝液の代わりに、水や培地等を使用しても構わない。菌体懸濁液の濃度は、OD₆₆₀が1～50の間が好適であるが、必要に応じて増減できる。

【0029】休止菌体反応の基質としては、たとえば、ジベンゾチオフェン、ジベンゾチオフェン誘導体、ベンゾチオフェンあるいはベンゾチオフェン誘導体を使用することが可能である。濃度は50ppm～5000ppmが好適であるが、必要に応じて増減できる。また、基質を添加する前に反応温度と同じ温度に反応液を予備加熱してもよい。休止菌体反応は30℃で行うのが好適であるが、25℃～37℃の任意の温度でもよく、また反応時間は1～2時間が好適であるが、必要に応じて増減できる。

【0030】また、休止菌体反応は、テトラデカン等の有機溶媒を添加した油水2相系で行っても構わない。この場合、用いる有機溶媒はテトラデカンの他、C₈～C₂₀のn-パラフィンやケロシン、軽油、重油などでもよい。また、必要ならば反応液上方の気相を酸素で置換封入しても構わない。また、上記反応の休止菌体に代えて、該菌体から分離、精製されたアルキル化ベンゾチオフェンおよび/またはアルキル化ジベンゾチオフェン系化合物のC-S結合の選択的な切断に関与する酵素を用いてもよい。

【0031】反応生成物の抽出は以下のようにして行うことができる。反応液を6規定の塩酸を用いてpH 2前後に調整した後、酢酸エチルを用いて攪拌抽出する。しかし、抽出に使用する溶媒は、酢酸エチルに限定されるものではなく、目的とする反応生成物が抽出できるものであればいずれの溶媒を用いても構わない。酢酸エチルの量は反応液に対し等量が好適であるが、必要に応じて増減できる。また、反応生成物の分離は、逆相C₁₈カラムあるいは順相シリカカラムを用いて行うことができるが、必要に応じて他のカラムを用いても構わない。また、分離に使用する方法はこれらの方法に限定されるものではなく、反応生成物が分離できる方法であればいかなる方法を用いても構わない。反応生成物の分析は、ガ

スクロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー／質量スペクトル分析、ガスクロマトグラフィー／原子発光検出分析、ガスクロマトグラフィー／フーリエ変換赤外分光分析、核磁気共鳴法、などを使用して行うことができる。また、必要に応じて他の分析方法を併せて利用しても構わない。さらに、分析に使用する方法はこれらの方法に限定されるものではなく、反応生成物が分析できる方法であればいずれの方法を使用しても構わない。

【0032】

【実施例】以下、本発明を実施例により具体的に説明する。ただし、本発明の技術的範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

【実施例1】 ジベンゾチオフェンを常温で分解する菌の分離

目的の微生物の分離には、唯一の硫黄源として硫黄分を約500ppm含有する水素化脱硫後の軽油（以下脱硫軽油）を含む表2の分離用培地を使用した。まず、キャブ付試験管（容量27ml、直径18mm×長さ180mm）に培地5ml、脱

分離用培地組成

Glucose	5.0g
KH ₂ PO ₄	0.5g
K ₂ HPO ₄	4.0g
NH ₄ Cl	1.0g
MgCl ₂ ・6H ₂ O	0.1g
NaCl	0.01g
CaCl ₂	0.02g
金属溶液	10ml
ビタミン混合物	1ml
蒸留水を加えて1Lとする	
pH	7.5
金属溶液	
FeCl ₂ ・4H ₂ O	0.5g
ZnCl ₂	0.5g
MnCl ₂ ・4H ₂ O	0.5g
CuCl ₂	0.05g
Na ₂ MoO ₄ ・2H ₂ O	0.1g
Na ₂ WO ₄ ・2H ₂ O	0.05g
Conc. HCl	10ml
蒸留水を加えて1Lとする	
ビタミン混合物	
パントテン酸 カリウム	400mg
イノシトール	200mg
ナイアシン	400mg
p-アミノベンゾエート	200mg
ピリドキシン・HCl	400mg
ビタミンB ₁₂	0.5mg
蒸留水を加えて1Lとする	

【0034】分離されたDBT分解菌株35株についてその脱硫活性の安定維持について調べた。すべての菌株について、容量14mlの密栓付き試験管に2 mlのL培地(1% Bacto Tryptone、0.5% 酵母抽出物、0.5% NaCl、pH 7.4)を加えたものに、A-DBT寒天培地上のコロニーを1白金耳かきとったものを接種し、30℃で振盪培養した。得られた培養液を容量14 mlの試験管に分注された新鮮なL培地 2 mlに 20 μl加え、さらに30℃で1日間培養した。これを数回繰り返す、最後に得られた培養液20 mlを100 ppmのDBTを含むA培地(A-DBT培地、表2) 2 mlに加え、30℃で3日間培養した。このA-DBT培養液を用いてガスクロマトグラフィー分析を行い、産生された2-HBPの定量を行った。具体的には、培養液に20 μlの6規

定脱硫油0.5ml、および日本各地より採集した土壌1スパーテル(約0.5g)を加え、30℃で一週間振盪培養(振盪速度120rpm)し集積培養を行った。培地に濁りの認められた試料については、その培養液0.5mlを新鮮な同培地に加え、集積培養を3~4回繰り返した。これらの集積培養により菌体の増殖が認められた試料について、培養物を生理食塩水にて希釈した。得られた希釈液を、硫黄分としてジベンゾチオフェンを25ppm含む培地に、終濃度2%となるように寒天を加えて作製したプレート上に塗布し、30℃で静置培養してコロニーを形成させた。形成したコロニーの一部をジベンゾチオフェンを含む培地に植菌し、ジベンゾチオフェンの脱硫黄によって生ずる2-ヒドロキシビフェニルの生成を調べた。2-ヒドロキシビフェニルの生成が認められたコロニーを選択し、前述の一連の操作を2回ないし3回繰り返すことにより目的の菌株を単離した。

【0033】

【表2】

定の塩酸を加え、低pHに調整した後、500 μlの酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル抽出画分をガスクロマトグラフィー分析の試料とした。A-DBT培地での増殖および2-HBPの産生が認められた菌株について、さらにL培地での増殖実験を繰り返して行った。上記と同様に、最後に得られた培養液20 μlをA-DBT培地2 mlに加え、30℃で3日間培養した。このA-DBT培養液を用いてガスクロマトグラフィー分析を行い、再度産生された2-HBPの定量を行った。最後までA-DBT培地で良好な増殖を示した菌株のうち、2-HBPの産生量が最も高かった菌株ロドコッカス エリスロポリス KA2-5-1株を選抜し、各種アルキル化ジベンゾチオフェン及びアルキル化ベンゾチオフェンに対する分解性を調べた。ロドコッカス (*Rhodococcus*) sp.

でDBT分解が最もよく調べられているIGTS8株については、脱硫活性がプラスミドにコードされていることが知られている(Denome, S. A., Oldfield, C., Nash, L. J. & Young, K. D. J. Bacteriol. 176, 6707-6716 (1994))。そこで、最後までA-DBT培地で良好な増殖を示し、2-HBPの産生が認められた菌株について、細胞からDNAを抽出し、アガロースゲル電気泳動法により分析したところ、すべての菌株でほとんど同じサイズのプラスミド様のバンドが検出された。これに対して、L培地では増殖するが、A-DBT培地ではほとんど増殖が認められなかった菌株について、L培地を用いて得られた培養物から同様の方法で抽出したDNA画分には、プラスミド様のバンドが検出されなかった。この結果から、我々が調べた菌株の脱硫活性の維持または喪失は、特定のプラスミドの維持または喪失と関連がある可能性が高いことが示唆された。

【0035】〔実施例2〕 微生物によるアルキル化ジベンゾチオフェン類の分解

ロドコッカス エリスロポリス KA2-5-1株を用いてアルキル化ジベンゾチオフェン類の脱硫率を測定した。対照株としてロドコッカス (*Rhodococcus*) sp. IGTS8 (ATCC 53968) を用いた。この菌株を対照株とした理由は、この菌株がDBTやその他の種々の有機硫黄化合物をC-S結合特異的に切断する微生物として知られており、さらに切断する硫黄化合物の種類が広範に調べられてお

り、また、そのDBT類に対する定量的な脱硫活性も報告されていて、高い活性を示すことが知られているためである。なお、この菌株はATCCより保存菌株として入手することができるものである。

【0036】ロドコッカス エリスロポリス KA2-5-1株およびIGTS8株の菌体培養物は、500ml容積付三角フラスコに25ppmジベンゾチオフェンを含む表3に示す増殖用培地を200ml添加し、予め同様の培地にて調製した前培養液を1%添加し30℃にて2日間振盪培養(100rpm)を行い調製した。この培養物を遠心分離(7,500rpm, 20分間)し、pH7のリン酸バッファーにて2回洗浄し、同リン酸バッファーに懸濁して反応用菌体とした。この反応用菌体の濁度は、測定波長660nmでは30であった。

【0037】脱硫反応は、L字型試験管(容量27ml、直径18mm×長さ180mm)に反応用菌体2ml、アルキル化ジベンゾチオフェン類を溶解したn-テトラデカン液(硫黄濃度約100ppm)2mlを加え、30℃にて18時間往復振盪することにより行った。反応液を遠心分離(12,000rpm, 10分間)し上澄の全硫黄分をパイロ蛍光法(アンテック製硫黄計モデル7000)にて測定した。アルキル化ジベンゾチオフェン類の相対脱硫率を表4に示す。

【0038】

【表3】

増殖用培地組成

Glucose	5.0g
KH ₂ PO ₄	0.5g
K ₂ HPO ₄	4.0g
NH ₄ Cl	1.0g
MgCl ₂ ・6H ₂ O	0.1g
CaCl ₂	0.02g
NaCl	0.01g
金属溶液	10ml
ビタミン混合物	1ml
蒸留水を加えて1Lとする	
pH	7.5
DBT	25ng
金属溶液	
FeCl ₂ ・4H ₂ O	0.5g
ZnCl ₂	0.5g
MnCl ₂ ・4H ₂ O	0.5g
CuCl ₂	0.05g
Na ₂ MoO ₄ ・2H ₂ O	0.1g
Na ₂ WO ₄ ・2H ₂ O	0.05g
Conc. HCl	10ml
蒸留水を加えて1Lとする	
ビタミン混合物	
パントテン酸カルシウム	400ng
イノシトール	200ng
ナイアシン	400ng
p-アミノベンゾ酸	200ng
ピリドキシン・HCl	400ng
ビタミンB ₁₂	0.5ng
蒸留水を加えて1Lとする	

【0039】

【表4】

アルキル化ジベンゾチオフェン類脱硫結果

アルキル化ジベンゾチオフェン類	相対脱硫率 (%)	
	KA2-5-1	IGTS8
ジベンゾチオフェン	100.00	100.00
2-メチルジベンゾチオフェン	98.31	88.92
3-メチルジベンゾチオフェン	99.90	86.30
4-メチルジベンゾチオフェン	99.30	95.77
4, 6-ジメチルジベンゾチオフェン	88.55	75.39
2, 8-ジメチルジベンゾチオフェン	81.66	62.86
3, 4, 6-トリメチルジベンゾチオフェン	60.15	43.17

【0040】また、ロドコッカス エリスロポリス KA2-5-1株は、これらの他に、1-メチルジベンゾチオフェン、2-エチルジベンゾチオフェン、3-エチルジベンゾチオフェン、3, 4, 6, 7-テトラメチルジベンゾチオフェンも分解することも確認されている。これらのメチルジベンゾチオフェン類化合物のロドコッカス エリスロポリス KA2-5-1株による分解産物について、GC/MS分析および¹H-NMR分析を行った結果、すべての種類の基質について、微生物による分解の結果モノヒドロキシ体に変換され、硫黄原子が除去されていることが確認された。

【0041】このように、ロドコッカス エリスロポリス KA2-5-1株は、複素環硫黄化合物であるDBTおよびアルキル化DBT類をC-S結合特異的に切断し、モノヒドロキシ体に変換する活性を有するが、これらの複素環硫黄化合物と共存させておいても、環開裂の結果生じると考えられる分解産物は一切検出されない。また、アルキル化ベンゾチオフェンに対しては、C-S結合を切断する活性を示すのに対し、アルキル化されていないベンゾチオフェン分子本体に対しては切断活性を示さない。さらに、1, 2-ベンゾジフェニレンスルフィド(ベンゾ[b]ナフト[2, 1-d]-チオフェン)を基質とした場合にも、その分解産物は、3つのベンゼン環構造はそのまま残った状態のモノヒドロキシ体であった。これらの結果から、KA2-5-1株、DBTを初めとする複素環硫黄化合物に対しては、C-S結合特異的に切断を起こし、C-C結合は切断しないと考えられる。

【0042】〔実施例3〕アルキル化ベンゾチオフェンの分解

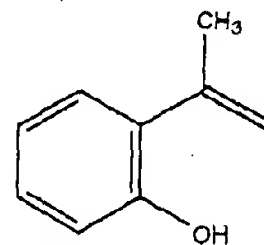
ロドコッカス エリスロポリス KA2-5-1株を用いて3-メチルベンゾチオフェンの分解性を調べ、その脱硫代謝物を特定した。500ml容壁付き三角フラスコに25ppmのジベンゾチオフェンを含む表3に記載の増殖培地200mlを入れたものにあらかじめ同じ培地で調製した前培養液を1%添加し、30℃にて振盪速度100rpmで2日間振盪培養した。この培養液を7,500rpm、20分間遠心し、得られた沈殿をpH7.0のリン酸緩衝液にて2回洗浄した。この結果、得られた沈殿を再度同じリン酸緩衝液に懸濁し、反应用菌体とした。この反应用菌体の測定波長660nmでの濁度は、30であった。

【0043】脱硫反応は、密栓付き試験管(容量1ml、直径16mm、長さ100mm)に反应用菌体1ml、3-メチルベンゾチオフェンのN,N-ジメチルホルムアミド溶液10μ

l(3-メチルベンゾチオフェン濃度は10,000ppm)を加え、30℃にて18時間回転振盪することにより行った。反応終了後、6規定の塩酸を10μl添加し、培養液を酸性に調整した後、1mlの酢酸エチルを添加し、3-メチルベンゾチオフェンの代謝物を酢酸エチル相に抽出した。この抽出物をGC/MS分析に用いた。図1にガスクロマトグラフィー・質量スペクトル分析の結果得られた3-メチルベンゾチオフェンのロドコッカス エリスロポリス KA2-5-1株による脱硫産物のガスクロマトグラムを、また、図2にはその質量スペクトルを示す。質量スペクトルから、脱硫産物の構造としては、以下のようものが推定された。

【0044】

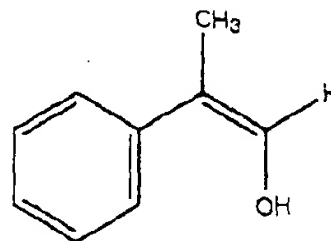
〔化1〕



【0045】または

【0046】

〔化2〕



【0047】上記のいずれの構造にしても、アルキル化ベンゾチオフェン分子から硫黄原子が除去されており、ロドコッカス エリスロポリス KA2-5-1株によりC-S結合特異的な脱硫反応が起きていることがわかる。

【0048】〔実施例4〕軽油の脱硫

ロドコッカス エリスロポリス KA2-5-1株を用いてアルキル化ジベンゾチオフェン類に富む化学的脱硫軽油(A軽油:硫黄分140ppm、B軽油:硫黄分800ppm)の脱硫率を測定した。対照株としては、ロドコッカス(Rhodococcus) sp. IGTS 8株を用いた。

【0049】反应用菌体、反応基質の調製、分析条件は

実施例 2 に記載の方法に従った。脱硫反応は、L 字型試験管（容量 27ml、直径 18mm×長さ 180mm）に反应用菌体 2ml、アルキル化ジベンゾチオフェン類を溶解した n-ヘトラデカン液（硫黄濃度約 100ppm）の代わりに軽油 2ml を加え、30℃にて 18 時間往復振盪を行った。次に、反応

軽油脱硫結果

軽油類	相対脱硫率 (%)	
	KA2-5-1	IGTS8
ジベンゾチオフェン	100.00	100.00
A 軽油	24.26	15.91
B 軽油	6.68	3.41

液を遠心分離（12,000rpm、10分間）し上澄の硫黄分をパイロ蛍光法（アンテック製硫黄計モデル 7000）にて測定した。観察された軽油類の相対脱硫率を表 5 に示す。

【0050】

【表 5】

【0051】

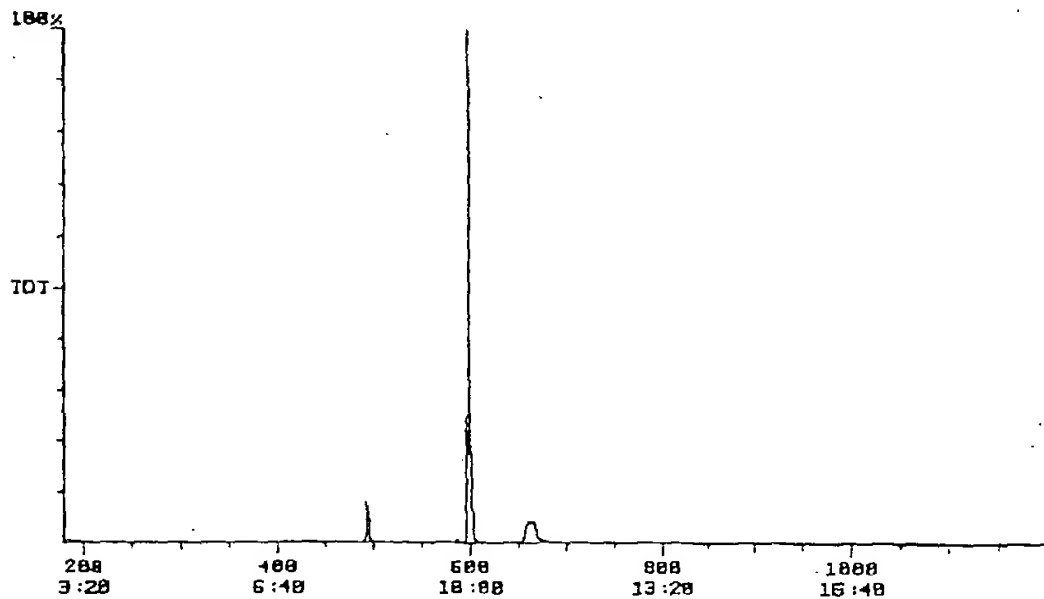
【発明の効果】本発明の微生物によれば、例えば、化石燃料中に含まれる高度難除去性複素環式硫黄化合物であるアルキル化ジベンゾチオフェン類及びアルキル化ベンゾチオフェン類の C-S 結合を特異的に効率よく分解することができる。したがって、この微生物を用いて石油等の脱硫を効果的に行うことができる。

【図面の簡単な説明】

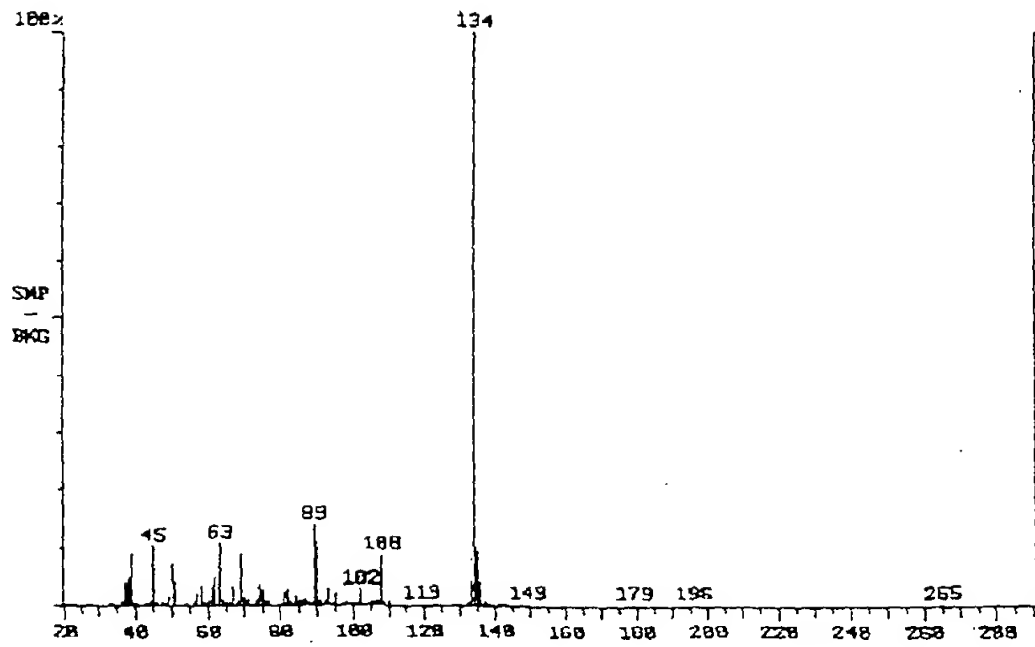
【図 1】3-メチルベンゾチオフェンのロドコッカス エリスロポリス KA2-5-1 株による脱硫産物のガスクロマトグラムを示す図。

【図 2】3-メチルベンゾチオフェンのロドコッカス エリスロポリス KA2-5-1 株による脱硫産物の質量スペクトルを示す図。

【図 1】



[図2]



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

識別記号

F I

C 1 2 R 1:01)

(C 1 2 S 1/02

C 1 2 R 1:01)